

## 9301 注射剂安全性检查法应用指导原则

本指导原则为化学药品及中药注射剂临床使用的安全性和制剂质量可控性而定。

注射剂安全性检查包括异常毒性、细菌内毒素（或热原）、降压物质（包括组胺类物质）、过敏反应、溶血与凝聚等项。根据处方、工艺、用法及用量等设定相应的检查项目并进行适用性研究。其中，细菌内毒素检查与热原检查项目间、降压物质检查与组胺类物质检查项目间，可以根据适用性研究结果相互替代，选择两者之一作为检查项目。

### 一、注射剂安全性检查项目的设定

#### 1. 静脉用注射剂

静脉用注射剂，均应设细菌内毒素（或热原）检查项。其中，化学药品注射剂一般首选细菌内毒素检查项；中药注射剂一般首选热原检查项，若该药本身对家兔的药理作用或对家兔的毒性反应影响热原检测结果，可选择细菌内毒素检查项。

所用原料系动植物来源或微生物发酵液提取物时，组分结构不清晰或有可能污染毒性杂质且又缺乏有效的理化分析方法的静脉用注射剂，应考虑设立异常毒性检查项。

所用原料系动植物来源或微生物发酵液提取物时，组分结构不清晰且有可能污染异源蛋白或未知过敏反应物质的静脉用注射剂，如缺乏相关的理化分析方法且临床发现过敏反应，应考虑设立过敏反应检查项。

所用原料系动植物来源或微生物发酵液提取物时，组分结构不清晰或有可能污染组胺、类组胺样降血压物质的静脉用注射剂，特别是中药注射剂，如缺乏相关的理化分析方法且临床发现类过敏反应，应考虑设立降压物质或组胺类物质检查项。

检查项目一般首选降压物质检查项，但若降血压药理作用与该药具有的功能主治有关，或对猫的反应干扰血压检测，可选择组胺类物质检查项替代。

中药注射剂应考虑设溶血与凝聚检查项。

#### 2. 肌内注射用注射剂

所用原料系动植物来源或微生物发酵液提取物时，组分结构不清晰或有可能

污染毒性杂质且又缺乏有效的理化分析方法的肌肉注射用注射剂，应考虑设立异常毒性检查项。

所用原料系动植物来源或微生物发酵液提取物时，组分结构不清晰或有可能污染异源蛋白或未知过敏反应物质的肌肉注射用注射剂，如缺乏相关理化分析方法且临床发现过敏反应，应考虑设立过敏反应检查项。

临床用药剂量较大，生产工艺易污染细菌内毒素的肌肉注射用注射剂，应考虑设细菌内毒素检查项。

### 3. 特殊途径的注射剂

椎管内、腹腔、眼内等特殊途径的注射剂，其安全性检查项目一般应符合静脉用注射剂的要求，必要时应增加其他安全性检查项目，如刺激性检查、细胞毒性检查。

### 4. 注射剂用辅料

注射剂用辅料使用面广，用量大，来源复杂，与药品的安全性直接相关。在其质量控制中，应根据辅料的来源、性质、用途、用法用量，配合理化分析方法，设立必要的安全性检查项目。

### 5. 其他

原料和生产工艺特殊的注射剂必要时应增加特殊的安全性检查项目，如病毒检查、细胞毒性检查等。

## 二、安全性检查方法和检查限值确定

检查方法和检查限值可按以下各项目内容要求进行研究。研究确定限值后，至少应进行3批以上供试品的检查验证。

### 1. 异常毒性检查

本法系将一定量的供试品溶液注入小鼠体内，规定时间内观察小鼠出现的死亡情况，以判定供试品是否符合规定。供试品的不合格表明药品中混有超过药物本身毒性的毒性杂质，临床用药将可能增加急性不良反应。

**检查方法** 参照异常毒性检查法（通则1141）。

**设定限值前研究** 参考文献数据并经单次静脉注射给药确定该注射剂的急性毒性数据（LD<sub>50</sub> 或LD<sub>1</sub> 及其可信限）。有条件时，由多个实验室或多种来源动物试验求得LD<sub>50</sub> 和LD<sub>1</sub> 数据。注射速度0.1ml/s，观察时间为72 小时。如使用其他动物、改变给药途径和次数、或延长观察时间和指标，应进行相应动物、

给药方法、观察指标、观察时间的急性毒性试验。

**设定限值** 异常毒性检查的限值应低于该注射剂本身毒性的最低致死剂量，考虑到实验室间差异、动物反应差异和制剂的差异，建议限值至少应小于LD<sub>1</sub>可信限下限的1/3(建议采用1/3~1/6)。如难以计算得最低致死量难以计算，可采用小于LD<sub>50</sub> 可信限下限的1/4(建议采用1/4~1/8)。如半数致死量与临床体重剂量之比小于20 可采用LD<sub>50</sub> 可信限下限的1/4 或LD<sub>1</sub> 可信限下限的1/3。如对动物、给药途径和给药次数、观察指标和时间等方法 and 限值有特殊要求时应在品种项下另作规定。

## 2. 细菌内毒素或热原检查

本法系利用鲎试剂（或家兔）测定供试品所含的细菌内毒素（或热原）的限量是否符合规定。不合格供试品在临床应用时可能产生热原反应而造成严重的不良后果。

**检查方法** 参照细菌内毒素检查法（通则1143）、热原检查法（通则1142）或单核细胞活化反应测定法，单核细胞活化反应测定法仅作为热原检查的补充方法（附：单核细胞活化反应测定法）。

**设定限值前研究** 细菌内毒素检查应进行干扰试验，求得最大无干扰浓度；热原检查应做适用性研究，求得对家兔无毒性反应、不影响正常体温和无解热作用剂量。

**设定限值** 细菌内毒素和热原检查的限值根据临床1 小时内最大用药剂量计算，细菌内毒素检查限值按规定要求计算，由于药物和适应症（如抗感染、抗肿瘤、心血管药等急重病症用药、儿童老人用药、复合用药、大输液等）的不同，限值可适当严格，至计算值的1/3~1/2，以保证安全用药。热原检查限值可参照临床剂量计算，一般为人用每千克体重每小时最大供试品剂量的2~5 倍（中药为3~5 倍），供试品注射体积每千克体重一般不少于0.5ml，不超过10ml。

细菌内毒素测定浓度应无干扰反应，热原限值剂量应不影响家兔正常体温。如有干扰或影响，可在品种项下增加稀释浓度、调节pH 和渗透压或缓慢注射等排除干扰或影响的特殊规定。

## 3. 降压物质检查

本法系通过静脉注射限值剂量供试品，观察对麻醉猫的血压反应，以判定供

试品中所含降压物质的限值是否符合规定。供试品的不合格表明药品中含有**超过限值以上**的影响血压反应的物质，临床用药时可能引起急性降压不良反应。

**检查方法** 参照降压物质检查法（通则1145）。

**设定限值前研究** 供试品按一定注射速度静脉注射不同剂量后（供试品溶液与组胺对照品溶液的注射体积一般应相同，通常为0.2~1ml/kg），观察供试品对猫血压**反应**的剂量反应关系，求得供试品降压物质检查符合规定的最大剂量（最大无降压反应剂量）。

**设定限值** 一般以临床单次用药剂量的1/5~5 倍作为降压**反应**物质检查剂量限值，急重病症用药尽可能采用高限。

特殊情况下，如供试品的药效试验有一定降血压作用，则可按猫最大无降压反应剂量的1/2~1/4 作为限值剂量；供试品原液静脉注射1ml/kg 剂量未见降压反应，该剂量可作为给药限值。

#### 4. 组胺类物质检查

本法系将一定浓度的供试品和组胺对照品依次注入离体豚鼠回肠浴槽内，分别观察出现的收缩反应幅度并加以比较，以判定供试品是否符合规定的一种方法。**不合格**供试品**不合格**表明**供试品中**含有组胺和类组胺物质，在临床上可能引起血压下降和类过敏反应等严重的不良反应。

**检查方法**参照“组胺类物质检查法”（通则1146）。

**设定限值前研究**在确定限值前，应考察供试品对组胺对照品引起的离体豚鼠回肠收缩反应的干扰（抑制或增强），求得最大无收缩干扰浓度。

**建立组胺类物质检查时，须进行方法适用性研究。**若供试品的处方、生产工艺等任何有可能影响试验结果的条件发生**改变**时，需重新进行**干扰试验方法适用性研究**。

**确定最小有效稀释浓度（MVC）** 最小有效稀释浓度是指在试验中供试品被允许达到最小稀释的浓度。

$$MVC = CSL/L$$

式中：CSL为低剂量组胺溶液的浓度， $\mu\text{g/mL}$

L为供试品组胺限值， $\mu\text{g/U}$

**方法适用性研究** **干扰试验**按组胺类物质检查法，依下列顺序准确注入供试品**稀释液**加对照品稀释液低剂量、对照品稀释液低剂量、供试品**稀释液**加对

照品稀释液高剂量、对照品稀释液高剂量 ( $d_{S1+T}$ 、 $d_{S1}$ 、 $d_{S2+T}$ 、 $d_{S2}$ )，重复=3次，如 $d_{S1+T}$ 及 $d_{S2+T}$ 所致的收缩反应值分别与对应组胺对照溶液即 $d_{S1}$ 及 $d_{S2}$ 所致的反应值基本一致（反应值差异在20%以内），则认为供试品不干扰组胺类物质检查；否则认为对组胺类物质检查法有干扰，应将供试品溶液进行稀释，且不超过规定MVC进行重试，必要时应另取动物重试。如仍不能得到有效结果时，则认为该品种不适合设立组胺类物质检查项，建议设立降压物质检查项，~~同时并应进行本法与降压物质检查法符合性的适用性研究。~~

**设定限值** 除特殊要求外，~~原则上与降压物质检查限值一致，以临床单次用药剂量的1/5~5倍量和每千克体重0.1~ $\mu$ g组胺剂量计算注射剂含组胺类物质检查限值，其计算公式为：限值采用下列计算公式确定检查限值(L)：~~

$$L=K/M$$

其中 K 值为人每千克体重可接受的组胺限量 ( $0.1 \mu\text{g/kg}$ )，

M 为~~降压物质检查限值 (mg/kg、ml/kg、IU/kg)~~人用每 kg 体重供试品剂量（人均体重按 60kg 计算），一般应不低于临床单次最大用药剂量。

供试品剂量应低于最大无收缩干扰剂量。~~抗肿瘤药、心血管疾病等急重病症用药应采用高限。~~

## 5. 过敏反应检查

本法系将一定量的供试品皮下或腹腔注射入豚鼠体内致敏，间隔一定时间后静脉注射供试品进行激发，观察豚鼠出现过敏反应的情况，以此判定供试品是否符合规定。供试品不合格表明注射剂含有过敏反应物质，临床用药时可能使患者致敏或产生过敏反应，引起严重不良反应。

**检查方法** 参照过敏反应检查法（通则1147）。

**设定限值前研究** 测定供试品对豚鼠腹腔(或皮下)和静脉给药的无毒性反应剂量。必要时，可采用注射剂的半成品原辅料进行致敏和激发研究，确定致敏方式和次数，在首次给药后14、21、28 天中选择最佳激发时间。

**设定限值** 致敏和激发剂量应小于该~~给药~~途径的急性毒性反应剂量，适当参考临床剂量。一般激发剂量大于致敏剂量。常用腹腔或鼠蹊部皮下注射途径致敏，每次每只0.5ml，静脉注射1ml 激发。如致敏剂量较小，可适当增加致敏次数，方法和限值的特殊要求应在品种项下规定。



## 6. 溶血与凝聚检查

本法系将一定量供试品与2%兔红细胞混悬液混合,温育一定时间后,观察其对红细胞的溶血与凝聚反应以判定供试品是否符合规定。

**检查方法** 参照溶血与凝聚检查法(通则1148)。

**设定限值前研究** 对注射剂原液和稀释液进行溶血与凝聚实验研究,指标除目测外可增加比色法和显微镜下观察的方法,同时观察溶血和凝聚,确定无溶血和凝聚的最大浓度。

**设定限值** 以无溶血和凝聚的最大浓度的1/2 作为限值浓度,一般应不低于临床最大使用浓度,如注射剂原液无溶血和凝聚反应则以原液浓度为限值。

## 附 单核细胞活化反应测定法(monocyte activation test, MAT)

本法系利用单核细胞或单核细胞系模拟人体,以细菌内毒素标准品为标准,检测并比较由标准品与供试品分别作用于单核细胞或单核细胞系所产生的活化反应,以释放的促炎症细胞因子(如IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )量来评价供试品中热原污染情况。从细菌内毒素标准量效曲线得出的内毒素浓度可等效于热原污染物浓度。

本法不适用于本身能刺激或抑制单核细胞促炎症因子的释放以及对细胞增殖有明显影响的供试品。

本法操作过程应防止微生物和热原的污染。

### 1. 实验材料

单核细胞可来源于健康人体的全血(Whole Blood, WB)、人外周血单核细胞(human peripheral blood monocytic cells, PBMC)和细胞系。可采用单人份来源或多人份等量混合的单核细胞。实验所用全血一般需用肝素抗凝(终浓度为15IU/ml)。制备PBMC溶液所用的培养基应添加适量来自供体的血浆或AB血清,制备单核细胞系溶液所用的细胞培养基应添加适量灭活的胎牛血清。

试验所用的细胞应符合中国药典对检定用细胞基质的要求(《中国药典》三部生物制品通则:生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程)。

试验所用相关试剂盒(如ELISA试剂盒)需经过验证,可定量检测相关促炎症因子。试验所用材料需经处理,以去除可能存在的热原。耐热器皿常用干热灭菌

法（250℃、30 分钟以上）去除热原，也可采用其他确证不干扰试验的适宜方法。若使用塑料材料，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无热原并对试验无干扰的材料。

## 2. 热原污染物限值的确定

供试品的热原污染物限值(contaminant limit concentration, CLC)可用内毒素量表示，按以下公式计算：

$$CLC=K/M$$

式中 CLC 为供试品的热原污染物限值，一般以 EU/ml、EU/mg 或 EU/U 表示。

$K$  为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量，以 EU/(kg·h)表示，注射剂  $K=5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ，放射性药品注射剂  $K=2.5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ，鞘内用注射剂  $K=0.2\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。

$M$  为人用每千克体重的最大供试品剂量，以 ml/(kg·h)、mg/(kg·h)或 U/(kg·h)表示，中国人均体重按 60kg 计算，人体表面积按 1.62m<sup>2</sup> 计算。注射时间若不足 1 小时，按 1 小时计算。

## 3. 确定最大有效稀释倍数

最大有效稀释倍数(Maximum Validation Dilution, MVD)是指在试验中供试品溶液被允许稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行污染物限值的检测。用以下公式计算 MVD：

$$MVD=CLC\times C/LOD$$

式中 CLC 为供试品的热原污染物限值

$C$  为供试品溶液浓度，当 CLC 以 EU/ml 表示时，则  $C$  等于 1.0ml/ml，当 CLC 以 EU/mg 或 EU/U 表示时， $C$  的单位为 mg/ml 或 U/ml。

LOD 为最低检测限。LOD(Limit of Detection)为所制备的细菌内毒素标准曲线（S 型四参数拟合曲线）的最低点浓度，该检测限所至单核细胞分泌的内热原量应不小于阈值（阴性对照的平均值加上其 3 倍的标准偏差）；若小于阈值，则将阈值代入上述四参数拟合曲线中，获得的浓度值即为最低检测限。

## 4. 标准曲线的可靠性试验

用不少于 4 个浓度的细菌内毒素标准品溶液制备标准曲线。阴性对照组

( $R_0=0$  EU/ml)所测内热原含量应尽量低(如 IL-6 参考值为 $<200$  pg/ml), 该值可反映人体的健康状况。标准曲线相关系数  $r \geq 0.90$ 。

对数剂量与反应值(必要时可进行适当的数据转换)的回归应有显著差异( $p < 0.01$ ); 对数剂量与反应值的回归不得显著偏离直线( $p > 0.05$ ), 若用四参数拟合, 所得曲线不得显著偏离理论曲线。

### 5. 干扰实验

在建立一个品种的 MAT 法时, 须先进行细菌内毒素加样回收干扰实验(所加浓度应接近标准曲线中点的细菌内毒素浓度), 当内毒素回收率在 50~200% 之间, 则认为此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。

按表 1 制备标准品与供试品溶液。将细菌内毒素标准品用细菌内毒素检查用水溶解, 在旋涡混合器上混匀 15 分钟, 然后用稀释剂制成所需浓度的内毒素标准溶液, 每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 秒。实验若采用新鲜全血, 一般使用氯化钠注射液作为标准品与供试品的稀释剂, 若采用冻存血、单核细胞系或 PBMC, 一般使用细胞培养基(如 IMDM、RPMI-1640 和 DMEM)作为标准品与供试品的稀释剂。

表 1 MAT 法干扰试验溶液的制备

编号	溶液	内毒素含量 (EU/ml)	平行孔数 (n)
A	供试品溶液	无	4
B	供试品溶液/2	无	4
C	供试品溶液/4	无	4
D	供试品溶液	标准曲线的中点 (或附近点) 的浓度	4
$R_0$	适宜稀释液	无	4
$R_1-R_n$	内毒素标准品溶液	不少于 4 个浓度的内毒素 标准品溶液	4

注: A 为对方法无干扰作用的最小稀释倍数的供试品溶液, 该最小稀释倍数不能超过供试品的 MVD。

B 为溶液 A 的 2 倍稀释液, 不能超过供试品的 MVD。



C 为溶液 A 的 4 倍稀释液，不能超过供试品的 MVD。

D 为加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知浓度内毒素，且与溶液 A 有相同稀释倍数的供试品溶液。

R0 为阴性对照。

R1-Rn 为各浓度内毒素标准品溶液(n≥4)。

将表 1 制备的标准品与供试品溶液分别加入到单核细胞或单核细胞系中，置 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育，孵育条件为 37±1℃，5%CO<sub>2</sub>，新鲜全血(如 1000 μl 氯化钠注射液+100μl 血液+100μl 标准品/供试品溶液)、冻存全血(如 500 μl 细胞培养基+50μl 血液+50μl 标准品/供试品溶液)、PBMC(如 125 μl 细胞液+125μl 标准品/供试品溶液)孵育时间一般为 24 小时，单核细胞系(如 200μl 细胞液+50μl 标准品/供试品溶液)为 24~48 小时。最终培养体系中单核细胞数约为 0.1~1.0×10<sup>6</sup>/ml，血浆或血清含量约为 1%。从制备单核细胞或单核细胞系到加入供试品的时间应控制在 4 小时内。

孵育后，可采用免疫化学法(如ELISA)检测孵育液中促炎细胞因子含量(如 PBMC—IL-6、全血—IL-6或IL-1β、人单核细胞系HL-60—IL-6)；如孵育液不能立即用于检测，可将其冻存(如-18℃、不超过30天)备用。

若使用 4 个不同个体来源的细胞进行 MAT，则每个个体的干扰试验均应符合要求。当使用单核细胞系或由多个(不少于 4 个)不同个体组成的混合细胞进行 MAT，则该混合细胞的干扰试验应符合要求。

**结果判断** 根据加入供试品中内毒素的回收率进行结果判断。

供试品的回收率=(C<sub>D</sub>-C<sub>A</sub>)÷加入的内毒素浓度×100%

式中C<sub>D</sub>为溶液D的内毒素浓度。

C<sub>A</sub>为溶液A的内毒素浓度。

当考察一个品种能否使用MAT法时，要求采用每个厂家至少3个批号的供试品进行干扰试验。该品种在不大于MVD的稀释倍数下不干扰时(包括采用某种方法能消除干扰)，该品种可采用MAT法。

## 6.检查法

按“干扰试验”中的操作步骤进行检测。然后用系列溶液 R1-Rn 生成的标准曲线，计算供试品溶液 A、B、C 每一个平行孔的内毒素浓度及供试品溶液 A、B、

C 的各平均内毒素浓度。

当试验的标准曲线达到要求，且供试品的回收率在 50~200%之间，试验方为有效。

## 7.结果判断

当使用 4 个不同个体来源的细胞进行 MAT 时，若在 4 个不同个体来源的 MAT 中，供试品溶液 A、B、C 的各平均内毒素浓度乘以相对应的稀释倍数后，各计算值均小于规定的限值(CLC)，则判供试品符合规定；若在 2 个或以上个体来源的 MAT 中，供试品溶液 A、B、C 的各平均内毒素浓度乘以相对应的稀释倍数后，任意一个计算值大于或等于规定的限值，则判供试品不符合规定；若仅 1 个个体来源的 MAT 中，供试品溶液 A、B、C 的各平均内毒素浓度乘以相对应的稀释倍数后，任意一个计算值大于或等于规定的限值(CLC)，则应另取 4 个不同个体来源的细胞进行复试，复试后，若在 7 个不同个体来源的 MAT 中，供试品溶液 A、B、C 的各平均内毒素浓度乘以相对应的稀释倍数后，均小于规定的限值(CLC)，则判供试品符合规定，否则，判供试品不符合规定。

当使用单核细胞系或由多个(不少于 4 个)不同个体组成的混合细胞进行 MAT，如供试品溶液 A、B、C 的各平均内毒素浓度乘以相对应的稀释倍数后，均小于规定的限值(CLC)，则判供试品符合规定，否则则判供试品不符合规定。